

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-248679

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月17日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 27/447

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26

3 3 1 E

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平10-62291

(22) 出願日 平成10年(1998) 2月26日

(71) 出願人 000232689

日本分光株式会社

東京都八王子市石川町2967番地の 5

(72) 発明者 岩田 哲朗

東京都八王子市石川町2967番地の 5 日本  
分光株式会社内

(72) 発明者 小勝負 純

東京都八王子市石川町2967番地の 5 日本  
分光株式会社内

(72) 発明者 黒須 泰行

東京都八王子市石川町2967番地の 5 日本  
分光株式会社内

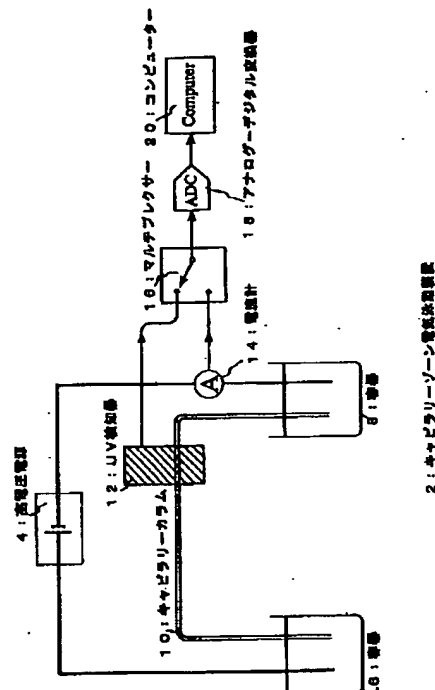
(74) 代理人 弁理士 岩橋 祐司

(54) 【発明の名称】 キャピラリーゾーン電気泳動装置

(57) 【要約】

【課題】 本発明はキャピラリーゾーン電気泳動装置から得られるエレクトロフェログラムの表記方法を改良することによって泳動時間の再現性の向上、及び定性定量精度を向上できる装置を提供することを目的とする。

【解決手段】 二つの電極槽内の緩衝溶液間を連通するキャピラリー10と、二つの電極槽内の緩衝溶液間に電位差を生じさせる電圧供給手段4と、前記キャピラリー10において分離された試料を検出する検出手段12と、前記緩衝溶液に流れる電流を検出する電流検出手段14と、前記電流検出手段14の出力を、時間で積分し電荷量に変換し、前記検出手段12の出力を前記電荷量の関数としてエレクトロフェログラムを作成する演算手段20を備えたことを特徴とするキャピラリーゾーン電気泳動装置。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 二つの電極槽内の緩衝溶液間を連通するキャピラリーと、

二つの電極槽内の緩衝溶液間に電位差を生じさせる電圧供給手段と、

前記キャピラリーにおいて分離された試料を検出する検出手段と、

前記緩衝溶液に流れる電流を検出する電流検出手段と、

前記電流検出手段の出力を、時間で積分し電荷量に変換し、前記検出手段の出力を前記電荷量の関数としてエレクトロフェログラムを作成する演算手段を備えたことを特徴とするキャピラリーゾーン電気泳動装置。

【請求項2】 前記検出出力と電荷量の関数として得られたエレクトロフェログラムから分離ピークの面積を算出し、ピーク面積で定量を行うことを特徴とする請求項1記載のキャピラリーゾーン電気泳動装置。

【請求項3】 緩衝溶液に中性マーカー試料を導入することによって、前記検出出力と電荷量の関数から、試料の検出ピークにおける電荷量と、中性マーカーの検出ピークにおける電荷量を導き出し、前記二つの電荷量から規格化された泳動指標 (AMI) を計算することを特徴とする請求項1又は2記載のキャピラリーゾーン電気泳動装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、キャピラリーゾーン電気泳動装置、特にリテンションタイムの再現性、及び成分の定性定量分析精度の向上に関する。

## 【0002】

【従来の技術】液体中にあるコロイド粒子や浮遊粒子に電場を与えた場合に粒子が移動する現象を電気泳動と言い、電気泳動法はこの現象を応用して、溶液中の荷電粒子の分離分析を行うものである。電気泳動法は、移動界面電気泳動法とゾーン電気泳動法に大別され、さらにゾーン電気泳動法は、毛細管を用いたキャピラリー電気泳動法と平盤な支持体を用いた支持体ゾーン電気泳動法に分類される。

【0003】キャピラリー電気泳動法には、キャピラリー等速電気泳動法、等電点電気泳動法、ゲル電気泳動法、動電クロマトグラフィー、キャピラリーゾーン電気泳動法などがあり、これらは、試料を直接検出できる、泳動管の再使用が可能、揮発性試料の分析が可能などの利点があり、今後の発展が期待されている。この中で、キャピラリーゾーン電気泳動法は、質量感度、分離効率、解析における速さに於いて他の分離技術よりも優れていると言われている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、キャピラリー

ゾーン電気泳動法には、濃度感度を向上するために注入体積及び泳動時間の再現性を改良しなければならないという克服すべき問題があった。これらは従来、キャピラリーゾーン電気泳動装置を用いて得られたエレクトロフェログラムを、縦軸に検出器によって得られた検出出力をとり、横軸に時間をとることによっていたために、緩衝溶液への印加電圧、キャピラリーの長さ、キャピラリーの内径、及び溶液の粘性係数の温度依存性によって、検出される泳動時間が異なってしまう、このため泳動時間の再現性が悪化してしまい、結果として定性定量分析の精度を落としてしまうというものであった。

【0005】本発明は上記課題に鑑みなされたものであり、キャピラリーゾーン電気泳動装置から得られるエレクトロフェログラムの表記方法を改良することによって泳動時間の再現性の向上、及び定性定量精度を向上できる装置を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するために、本発明にかかるキャピラリーゾーン電気泳動装置は、二つの電極槽内の緩衝溶液間を連通するキャピラリーと、二つの電極槽内の緩衝溶液間に電位差を生じさせる電圧供給手段と、前記キャピラリーにおいて分離された試料を検出する検出手段と、前記緩衝溶液に流れる電流を検出する電流検出手段と、前記電流検出手段の出力を、時間で積分し電荷量に変換し、前記検出手段の出力を前記電荷量の関数としてエレクトロフェログラムを作成する演算手段を備えたことを特徴とする。

【0007】また本発明において、前記検出出力と電荷量の関数として得られたエレクトロフェログラムから分離ピークの面積を算出し、ピーク面積で定量を行うことが好適である。また本発明において、緩衝溶液に中性マーカー試料を導入することによって、前記検出出力と電荷量の関数から、試料の検出ピークにおける電荷量と、中性マーカーの検出ピークにおける電荷量を導き出し、前記二つの電荷量から規格化された泳動指標 (AMI) を計算することが好適である。

## 【0008】

【発明の実施形態】本発明を為すに至る背景には、YeungとLeeによってキャピラリーゾーン電気泳動法に取り入れられた、MI (migration index) とAMI (adjusted migration index) がある。

【0009】キャピラリーゾーン電気泳動法におけるネット (正味の) 泳動速度 $v_a$ は、電気浸透流速度を $v_{eo}$ 、試料の電気泳動速度を $v_s$ とすると、

$$v_a = v_{eo} + v_s$$

と表され、これらはさらに、

【数1】

$$\nu_m = \frac{\epsilon E}{\eta} \left[ \zeta_c + \frac{2}{3} \zeta_a f(\kappa a) \right] \quad \dots (1)$$

と表される。ここで $\epsilon$ は電極間に存在する物質の誘電率、 $E$ は、印加電圧 $V$ 、キャピラリーの全長 $L$ によって、 $E = V/L$ で表される電界強度、 $\eta$ は粘性係数、 $\zeta_c$ は、キャピラリー内壁の $\zeta$ ポテンシャル、 $\zeta_a$ は試料の $\zeta$ ポテンシャル、 $\kappa$ は試料の電氣的二重層厚さの逆数、\*

\*  $a$ は試料半径、そして $f(\kappa a)$ は、緩衝液中の試料の外形と $\kappa a$ に依存する関数である。  
【0010】そして、泳動時間 $t_a$ は、  
【数2】

$$t_a = \frac{L_{eff}}{\nu_a} = \frac{\eta L_{eff}}{\epsilon E \left[ \zeta_c + \frac{2}{3} \zeta_a f(\kappa a) \right]} \quad \dots (2)$$

と表される。電流と電場の関係から、 $E = i/k$  ( $i$ は電流密度、 $k$ は伝導率) が成り立つから、(2)式及び※

※ (1) 式から、  
【数3】

$$\nu_a = \frac{dx}{dt} = \frac{L_{eff}}{t_a} = \frac{\epsilon i}{k \eta} \left[ \zeta_c + \frac{2}{3} \zeta_a f(\kappa a) \right] \quad \dots (3)$$

と変形できる。 $x$ はキャピラリーの軸方向距離、 $t$ は時間である。そして $k\eta$ はワルデン積と呼ばれる積であり、この積は、適当な条件下では、温度依存性が非常に★

★小さくなることが報告されている。  
【0011】ワルデンの法則を受け入れ、 $MI$ を、  
【数4】

$$MI \equiv \int_0^{t_a} \frac{i}{L_{eff}} dt \quad \dots (4)$$

$$= \frac{k \eta}{\epsilon \left[ \zeta_c + \frac{2}{3} \zeta_a f(\kappa a) \right]} \quad \dots (5)$$

ように定義する。すると、(5)式から $MI$ は、 $\zeta_c$ と、 $\zeta_a f(\kappa a)$ に依存していることがわかる。

☆を一定時間間隔で検出し、積分することによって容易に計算できるものであることを見出した。

【0012】本発明者は、(4)式から、 $MI$ は、電荷量に比例することを見出し、この電荷量を $MIC$  (migration index with quantity of electric charge) と名付けた。さらに $MIC$ は、キャピラリー内を通る電流☆

【0013】さらに本発明者らが定義した $MIC$ によって、YeungとLeeが提唱した $AMI$ は、次のよう

40 に表せる。  
【数5】

$$AMI \equiv \frac{MIC_{e0} MIC}{MIC_{e0} - MIC} \quad \dots (6)$$

$$= \frac{3 k \eta}{2 \epsilon \zeta_a f(\kappa a)} \quad \dots (7)$$

ここで、 $MIC_{e0}$ とは、中性マーカー試料の $MIC$ 値で◆50◆あり、次式によって与えられる。

【数6】

$$MIC_{eo} = \frac{k\eta}{\epsilon \zeta c} \dots (8)$$

式(7)からわかるように、AMIは、試料の性質によって決まる $\alpha f(\kappa a)$ にのみ依存していることが理解できる。

【0014】MIを使用すると、印加電圧、キャピラリー長、キャピラリー内径、緩衝溶液の粘性係数とその温度依存性の影響をキャンセルすることができ、さらに中性マーカーを導入し、AMIを使用すればキャピラリー管壁と緩衝溶液管のポテンシャルの影響もキャンセルされる。

【0015】本発明者は、使用するキャピラリーゾーン電気泳動装置を同一にすると言う前提で、通常は横軸が時間でプロットされるエレクトロフェログラムを、電荷量でプロットすることを提案した。前述したように電荷量とMIは比例関係にあり、同一のキャピラリー電気泳動装置を使用する限り電荷量とMIは同様の意味を持つ。従って印加電圧、キャピラリー長、キャピラリー内径、緩衝溶液の粘性係数とその温度依存性の影響をキャンセルすることができるため、定性定量分析の精度の向上が期待される。以上のような理論に基づき、本発明者らの鋭意研究の結果、本発明を為すに至ったものである。

【0016】以下、実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明する。

【実施例】図1は、本発明による一実施例を示した装置概要図である。このキャピラリーゾーン電気泳動装置2は、キャピラリーカラム10を介して連通された二つの電極槽である容器6、8内の緩衝溶液に電位差を生じさせる電圧供給手段としての高電圧電源4、緩衝溶液中の混合された試料を分離する分離手段としてのキャピラリーカラム10、分離手段において分離された試料を検出する検出手段としてのUV検知器12と、緩衝溶液に流れる電流値を検出する電流検出手段としての電流計14、検出手段及び電流検出手段からの出力を時分割で取り込み可能にするマルチプレクサー16と、アナログ信号をデジタル信号に変換するアナログ-デジタル変換器18、演算手段であるコンピューター20を備える。

【0017】高電圧電源4は電極の一端を容器6内に、他端を容器8内に浸漬されることによって両容器6、8内の緩衝溶液に電位差を与える。容器6、容器8内の緩衝溶液はキャピラリーカラム10を介して連通されている。このような構成によって電氣的ループが形成され、緩衝溶液に電流が流れる。緩衝溶液に流れる電流は、前記ループにおいて容器8内に浸漬された電極と高電圧電源4との間の導線に取り付けられた電流計14によって測定される。測定対象となる混合試料はキャピラリーカラム10の高電圧電源のプラス側に注入され、緩衝溶液

に生じた電気浸透流のもとで、それぞれの試料の移動度の差異から分離され、キャピラリーカラム10に取り付けられたUV検出器12によって検出される。

【0018】電流計14によって測定された電流値とUV検出器12によって検出された検出力は、マルチプレクサー16によってほぼ同時にアナログ-デジタル変換器18を通してデジタル信号に変換されコンピューター20に送信される。コンピューター20は、電流値と時間から電荷量を算出し、さらに時間の関数である検出力を、電荷量の関数に変換し、検出力と電荷量の関数のエレクトロフェログラムを作成する。

【0019】また、コンピューター20は、電荷量の関数として得られたエレクトロフェログラムから分離ピークの面積を算出し、ピーク面積で定量を行うこと、また緩衝溶液に中性マーカー試料を導入することによって、検出力と電荷量の関数から、試料の検出ピークにおける電荷量と、中性マーカーの検出ピークにおける電荷量を導き出し、二つの電荷量からAMIを計算することもできるようにもプログラムされている。

【0020】この装置を用いてベンジルアルコール(BA)、ピリドキサル(PL)、アデノシン5'-リン酸(AMP)、ピリドキサミン(PM)、アデノシン3':5'-環状リン酸(c-AMP)を混合した試料を用いて実験を行った。使用した水は、脱イオン化された蒸留水を用い、緩衝液は、pH8.0のリン酸ナトリウムを用いた。

【0021】この電気泳動装置2は、完全に自動化されており、キャピラリーカラムは、外径375 $\mu$ m、内径50 $\mu$ m、全長60cm(有効長 $L_{eff}$ =45cm)の未溶解シリカキャピラリーを使用している。キャピラリーカラム10は、使用に先立ち、2000mbar下で1分間緩衝液に浸けられ、次いで1分間0.1M酸化ナトリウム溶液に浸けられ、再び1分間緩衝液に浸けられて、さらに30秒間5kVの電圧下で使用するという標準洗浄過程を四度繰り返してある。さらに実験前、及び実験の間にもその標準洗浄過程を繰り返した。実験中には、容器6、8の温度を10℃に保った。そして、キャピラリーカラム10の有効長45cmの内のおよそ20cmを35℃から60℃の間で一定温度に保てるように調整できるようになっている。ピークの検出には、JASCO製のUV/VIS(紫外線-可視光)検知器CE-970(12)を使用した。

【0022】データ収集は、システムからの混合試料注入信号によって開始され、0.1秒ごとにコンピューター20にデータが取り込まれるようになっている。試料の注入はハイドロダイナミックコンプレッション法によって行った。その条件は20mbar、6秒間である。試料のそれぞれの濃度は、2%(v/v)(BA)、0.83mg/ml(PL)、0.33mg/ml(AMP)、2.5mg/ml(PM)、0.33mg/ml

(c-AMP)であった。

【0023】[実験1] 実験1では、キャピラリー温度を35℃に保ったまま、キャピラリーカラム間の印加電圧を5kVから30kVまで5kVごとに变化させた。\*

\*実験によって、現れたピークごとに、測定された泳動時間 $t_m$ と分離ピークから計算されたMIC値を印加電圧ごとにまとめたものが次の表1である。

【表1】

電圧	ピーク1		ピーク2		ピーク3		ピーク4		ピーク5	
	$t_m$	MIC	$t_m$	MIC	$t_m$	MIC	$t_m$	MIC	$t_m$	MIC
30	86	0.994	92	1.068	115	1.351	136	1.612	181	2.169
30	86	0.996	92	1.069	114	1.341	136	1.616	180	2.166
25	117	0.947	131	1.064	153	1.247	195	1.602	260	2.150
25	117	0.950	131	1.068	153	1.252	195	1.604	260	2.150
20	164	0.925	190	1.073	214	1.211	284	1.615	380	2.167
20	164	0.925	188	1.070	213	1.214	282	1.614	378	2.171
15	250	0.940	289	1.088	324	1.221	435	1.643	587	2.222
15	252	0.945	291	1.092	327	1.228	438	1.649	592	2.232
10	386	0.924	454	1.088	503	1.206	683	1.641	918	2.210
10	393	0.923	463	1.088	512	1.204	699	1.648	940	2.221
5	775	0.905	923	1.073	1011	1.180	1388	1.618	1855	2.160
5	771	0.906	913	1.078	1003	1.179	1371	1.613	1827	2.192
RSD	74.5%	3.0%	76.5%	0.9%	74.4%	4.1%	76.6%	1.0%	76.4%	1.3%

【0024】なお表1の電圧とは、印加電圧を示しており、 $t_m$ の単位はsec、MICの単位は $\times 10^{-2}C$ である。またそれぞれのピークは、ピーク1がPM、ピーク2がBA、ピーク3がPL、ピーク4がc-AMP、ピーク5がAMPによるものである。そして、印加電圧の最下段にあるRSDは、それぞれのピークの $t_m$ 、MICの相対標準偏差である。

【0025】表1を見てわかるとおり、それぞれのピークを見て印加電圧が変わると、泳動時間 $t_m$ も大きく変わってしまっており相対標準偏差も75%近くに及んでいるが、MICにおいては、印加電圧を変えてもなお、ほぼ一定の値を得ることができており、相対標準偏差も5%以下になっている。

【0026】さらに図2にはこの実験によって得られたエレクトロフェログラムが時間の関数で示されており、図3には、実験中、図2のデータと同時に収集された電\*

※気泳動電流の変動が時間の関数で示されている。この二つの図を見ると印加電圧が増加するに従って、電流値が増加しており、泳動時間も短くなっていることが見て取れる。

【0027】図4には、図2、3に示されたデータを使うことによって、式(4)に従って横軸がMICに変形されたエレクトロフェログラムが示されている。これを見ると印加電圧に影響されることがなく、どのピークもだいたい符合していることがわかる。よって印加電圧に対する定性分析の精度が向上されているのがわかる。

【0028】次に、それぞれのピークについて、時間の関数で示されたエレクトロフェログラム、MICの関数で示されたエレクトロフェログラムからピーク面積を計算した。その結果を示したものが次の表2である。

【表2】

電圧	ピーク1		ピーク2		ピーク3		ピーク4		ピーク5	
	A( $t_m$ )	A(MIC)	A( $t_m$ )	A(MIC)	A( $t_m$ )	A(MIC)	A( $t_m$ )	A(MIC)	A( $t_m$ )	A(MIC)
30	1.52	1.862	0.86	1.054	1.24	1.534	2.55	3.130	3.05	3.764
30	1.53	1.873	0.96	1.178	1.27	1.569	2.11	2.629	2.71	3.398
25	2.24	1.866	1.55	1.288	1.70	1.425	3.59	3.016	4.50	3.824
25	2.22	1.849	1.30	1.106	1.71	1.417	3.28	2.757	4.43	3.716
20	3.37	1.923	2.18	1.257	2.12	1.215	4.99	2.871	6.33	3.650
20	3.31	1.908	2.31	1.332	2.05	1.193	4.92	2.867	6.32	3.680
15	4.49	1.697	3.09	1.174	3.52	1.333	7.77	2.966	9.53	3.645
15	4.98	1.877	3.03	1.144	3.62	1.360	7.30	2.761	9.64	3.646

9	10									
10	7.27	1.743	5.13	1.231	5.13	1.241	11.95	2.883	15.56	3.753
10	7.59	1.793	5.37	1.270	5.49	1.293	12.47	2.967	16.33	3.917
5	15.67	1.819	11.35	1.322	11.54	1.336	26.96	3.112	34.04	3.945
5	16.15	1.902	10.69	1.218	11.55	1.350	26.52	3.175	34.85	4.111
RSD	77.8%	5.5%	81.7%	6.7%	80.1%	9.4%	81.5%	6.0%	81.9%	4.7%

【0029】なお表2の電圧とは、表1同様、印加電圧を示しており、A(t<sub>0</sub>)が時間の関数で示されたエレクトロフェログラムからのピーク面積、A(MIC)がMICの関数で示されたエレクトロフェログラムからのピーク面積である。この表2におけるA(MIC)の値は、すべて×10<sup>-4</sup>が省略されているので注意されたい。印加電圧の最下段にあるRSDは、それぞれのピークのA(t<sub>0</sub>)、A(MIC)の相対標準偏差である。  
【0030】表2を見てわかるとおり、それぞれのピークを見ても印加電圧が変わると、泳動時間t<sub>0</sub>が表す \*

\*ピーク面積も大きく変わってしまっており相対標準偏差も80%越えるものがほとんどであるが、MICが表すピーク面積は、印加電圧を変えてもなお、ほぼ一定の値を得ることができており、相対標準偏差も10%以下になっている。このことから印加電圧変動に対する定量分析の精度が向上されているのがわかる。

【0031】さらに、式(7)によってピーク2を中性マーカーとして使い、それぞれのAMIの値を計算したものが次の表3である。

【表3】

電圧	ピーク1 AMI	ピーク3 AMI	ピーク4 AMI	ピーク5 AMI
30	1.443×10 <sup>-1</sup>	-5.095×10 <sup>-2</sup>	-3.166×10 <sup>-2</sup>	-2.104×10 <sup>-2</sup>
30	1.446×10 <sup>-1</sup>	-5.276×10 <sup>-2</sup>	-3.162×10 <sup>-2</sup>	-2.112×10 <sup>-2</sup>
25	8.628×10 <sup>-2</sup>	-7.227×10 <sup>-2</sup>	-3.165×10 <sup>-2</sup>	-2.105×10 <sup>-2</sup>
25	8.645×10 <sup>-2</sup>	-7.244×10 <sup>-2</sup>	-3.191×10 <sup>-2</sup>	-2.121×10 <sup>-2</sup>
20	6.676×10 <sup>-2</sup>	-9.441×10 <sup>-2</sup>	-3.203×10 <sup>-2</sup>	-2.127×10 <sup>-2</sup>
20	7.155×10 <sup>-2</sup>	-9.005×10 <sup>-2</sup>	-3.170×10 <sup>-2</sup>	-2.108×10 <sup>-2</sup>
15	6.927×10 <sup>-2</sup>	-1.002×10 <sup>-1</sup>	-3.223×10 <sup>-2</sup>	-2.132×10 <sup>-2</sup>
15	7.009×10 <sup>-2</sup>	-9.852×10 <sup>-2</sup>	-3.233×10 <sup>-2</sup>	-2.138×10 <sup>-2</sup>
10	6.155×10 <sup>-2</sup>	-1.111×10 <sup>-1</sup>	-3.228×10 <sup>-2</sup>	-2.142×10 <sup>-2</sup>
10	6.076×10 <sup>-2</sup>	-1.130×10 <sup>-1</sup>	-3.201×10 <sup>-2</sup>	-2.132×10 <sup>-2</sup>
5	5.667×10 <sup>-2</sup>	-1.240×10 <sup>-1</sup>	-3.226×10 <sup>-2</sup>	-2.150×10 <sup>-2</sup>
5	5.814×10 <sup>-2</sup>	-1.188×10 <sup>-1</sup>	-3.203×10 <sup>-2</sup>	-2.139×10 <sup>-2</sup>
RSD	36.2%	23.4%	0.9%	0.7%

なお表3の電圧とは、前記の表1、2同様、印加電圧を示している。印加電圧の最下段にあるRSDは、それぞれのピークのAMIの相対標準偏差である。

【0032】表3を見てわかるとおり、ピーク4、5については、MICで得られたものよりも印加電圧の依存性がさらに除かれており、相対標準偏差も1%以下に抑えられており、きわめて精度が高い。しかしピーク1、3についてはMICで得られたものよりも数値のばらつきが大きくなり、相対標準偏差については、ピーク1は30%を越えてしまい、ピーク2は20%を越えてしまった。この原因は、ピーク1、3は共にピーク2近傍に出現したため、式(6)の分母であるMIC<sub>0</sub> - MICが0に近づくためと、試料の解離度はキャピラリーカラム内の局部温度変化によって変動するため、緩衝溶液と試料溶液のpH値が関係しているためと推定される。こ※

※の温度変化は、印加電圧を高くするほどジュール熱の発生などによって大きくなる。このようなケースの場合、試料のポテンシャルが変動し、結果としてMIやAMIを使うことを無効にしてしまうことが考えられる。それでもなお、中性マーカーから離れたピークについては、格段により結果が得られることがわかり、これらについての定性精度は極めて高いことがわかる。

【0033】[実験2] 実験2では、キャピラリーカラム間に印加する電圧を15kVに保ったまま、キャピラリー温度を10℃ごとに40℃から60℃に変化させて実験した。実験によって、現れたピークごとに、測定された泳動時間t<sub>0</sub>と分離ピークから計算されたMIC値を印加電圧ごとにまとめたものが次の表4である。

【表4】

1 1								1 2		
温度	ピーク 1		ピーク 2		ピーク 3		ピーク 4		ピーク 5	
℃	t <sub>a</sub>	MIC	t <sub>a</sub>	MIC	t <sub>a</sub>	MIC	t <sub>a</sub>	MIC	t <sub>a</sub>	MIC
60	210	0.916	243	1.077	275	1.203	365	1.628	486	2.142
50	221	0.907	259	1.065	288	1.186	389	1.609	519	2.154
40	234	0.909	277	1.061	305	1.187	417	1.604	558	2.184

【0034】なお表4の温度とは、キャピラリー温度を示しており、t<sub>a</sub>の単位はsec、MICの単位は×10<sup>-2</sup>Cである。それぞれのピークは、ピーク1がPM、ピーク2がBA、ピーク3がPL、ピーク4がc-AMP、ピーク5がAMPによるものであることは実験1と同じである。

【0035】表4を見てわかるとおり、それぞれのピークを見てもキャピラリー温度が変わると、泳動時間t<sub>a</sub>も大きく変わってしまっているが、MICにおいては、キャピラリー温度を変えてもなお、ほぼ一定の値を得ることができている。

【0036】さらに図5にはこの実験によって得られたエレクトロフェログラムが時間の関数で示されており、図6には、実験中、図2のデータと同時に採取された電気泳動電流の変動が時間の関数で示されている。この二\*

\*つの図を見るとキャピラリー温度が増加するに従って、電流値が増加しており、泳動時間も短くなっていることが見て取れる。

【0037】図7には、図5、6に示されたデータを使うことによって、式(4)に従って横軸がMICに変形されたエレクトロフェログラムが示されている。これを見るとキャピラリー温度に影響されことなく、どのピークもだいたい符合していることがわかる。よって温度変動に対する定性分析の精度が向上されていることがわかる。

【0038】次に、それぞれのピークについて、時間の関数で示されたエレクトロフェログラム、MICの関数で示されたエレクトロフェログラムからピーク面積を計算した。その結果を示したものが次の表5である。

【表5】

温度	ピーク1		ピーク2		ピーク3		ピーク4		ピーク5	
℃	A(t <sub>a</sub> )	A(MIC)	A(t <sub>a</sub> )	A(MIC)	A(t <sub>a</sub> )	A(MIC)	A(t <sub>a</sub> )	A(MIC)	A(t <sub>a</sub> )	A(MIC)
60	4.76	2.108	2.93	1.300	3.18	1.408	7.44	3.308	9.14	4.081
50	4.49	1.876	2.96	1.233	2.84	1.186	7.51	3.143	9.12	3.835
40	4.76	1.863	3.17	1.246	2.95	1.164	7.78	3.064	10.04	3.946

なお表5の温度とは、表4同様、キャピラリー温度を示しており、A(t<sub>a</sub>)が時間の関数で示されたエレクトロフェログラムからのピーク面積、A(MIC)がMICの関数で示されたエレクトロフェログラムからのピーク面積である。この表5におけるA(MIC)の値は、すべて×10<sup>-4</sup>が省略されているので注意されたい。

【0039】表5を見てわかるとおり、それぞれのピークを見てもキャピラリー温度が変わると、泳動時間t<sub>a</sub>が表すピーク面積も変わってしまっているが、MIC ※

※が表すピーク面積は、キャピラリー温度を変えても、泳動時間によって表されたピーク面積のものより変化の小さい値を得ることができている。このことから温度変動に対する定量精度が向上されているのがわかる。

【0040】さらに、式(7)によってピーク2を中性マーカーとして使い、それぞれのAMIの値を計算したものが次の表6である。

【表6】

温度	ピーク1	ピーク3	ピーク4	ピーク5
℃	AMI	AMI	AMI	AMI
60	6.665×10 <sup>-2</sup>	-9.014×10 <sup>-2</sup>	-3.138×10 <sup>-2</sup>	-2.103×10 <sup>-2</sup>
50	6.115×10 <sup>-2</sup>	-1.044×10 <sup>-1</sup>	-3.150×10 <sup>-2</sup>	-2.107×10 <sup>-2</sup>
40	5.806×10 <sup>-2</sup>	-1.165×10 <sup>-1</sup>	-3.183×10 <sup>-2</sup>	-2.126×10 <sup>-2</sup>

なお表6の温度とは、前記の表4、5同様、キャピラリー温度を示している。

【0041】表6を見てわかるとおり、ピーク4、5に★50

★については、MICで得られたものよりも印加電圧の依存性がさらに除かれており、きわめて精度が高い。しかしピーク1、3についてはMICで得られたものよりも数

13

値のばらつきが大きくなってしまった。この原因については表3で述べたものと同様である。しかし、中性マーカーから離れたピークについては、格段により結果が得られることがわかり、これらについての定性精度は極めて高いことがわかる。

#### 【0042】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、電荷量の関数として表したエレクトロフェログラムを作成することができることによって、キャピラリーゾーン電気泳動法の問題点であった、温度依存性や印加電圧、

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による一実施例を示した装置概要図である。

【図2】実験1の結果を、時間の関数で表したエレクトロフェログラムである。

【図3】実験1の泳動電流を、時間の関数で表したグラフである。

14

【図4】実験1の結果を、電荷量の関数で表したエレクトロフェログラムである。

【図5】実験2の結果を、時間の関数で表したエレクトロフェログラムである。

【図6】実験2の泳動電流を、時間の関数で表したグラフである。

【図7】実験2の結果を、電荷量の関数で表したエレクトロフェログラムである。

#### 【符号の説明】

2：キャピラリーゾーン電気泳動装置

4：高電圧電源

6、8：容器

10：キャピラリーカラム

12：UV検知器

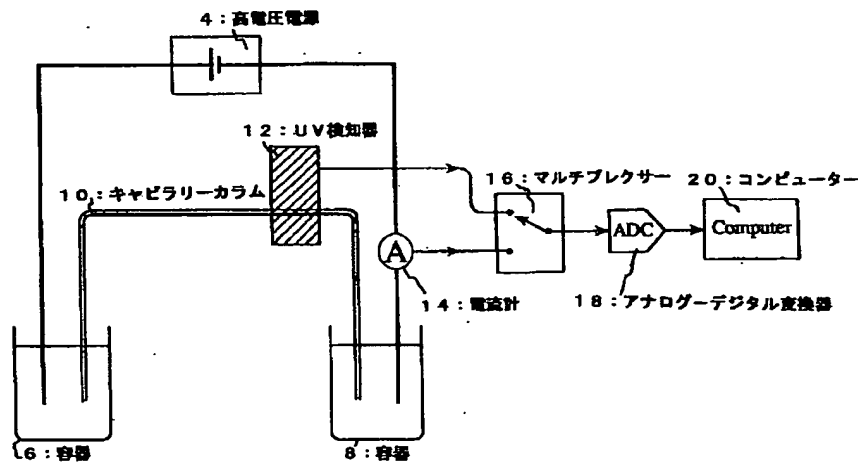
14：電流計

16：マルチプレクサー

18：アナログ-デジタル変換器

20：コンピューター

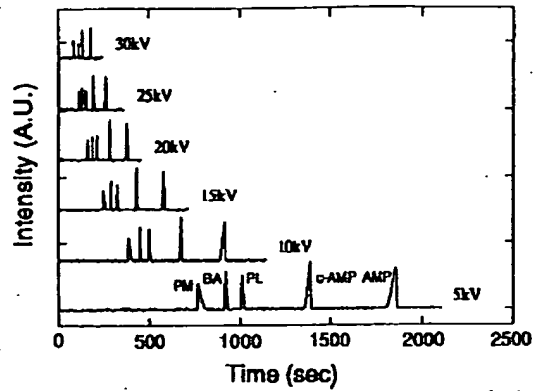
【図1】



2：キャピラリーゾーン電気泳動装置

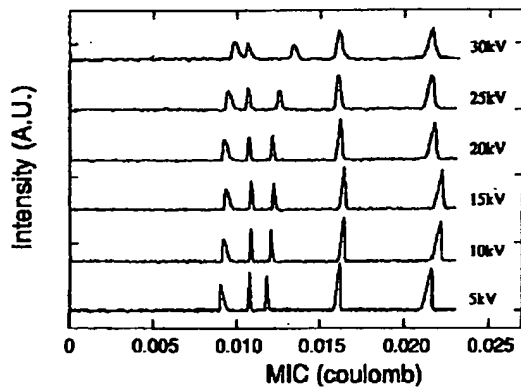


【図2】



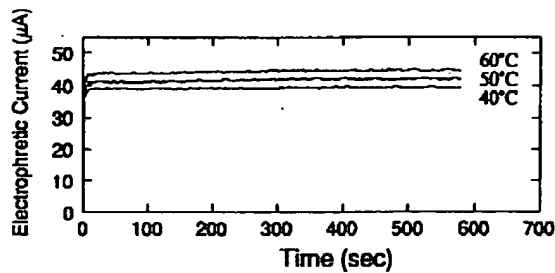
実験Ⅰの結果を、時間の関数で表したエレクトロフェログラム

【図4】



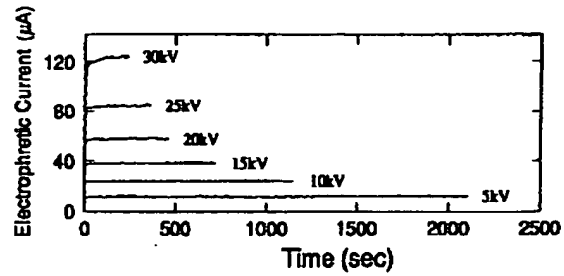
実験Ⅰの結果を、電荷量の関数で表したエレクトロフェログラム

【図6】



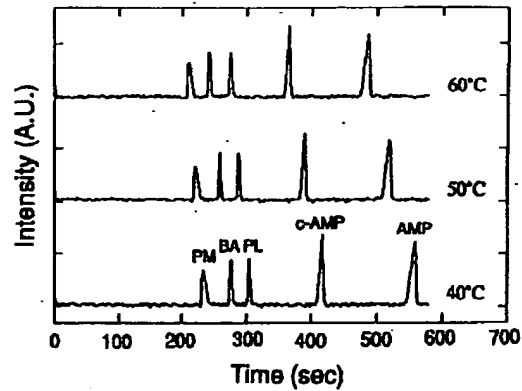
実験Ⅱの泳動電流を、時間の関数で表したグラフ

【図3】



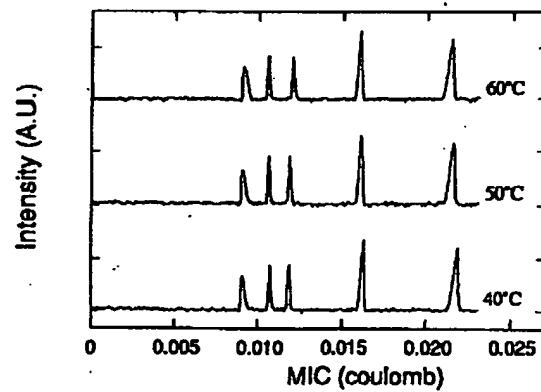
実験Ⅰの泳動電流を、時間の関数で表したグラフ

【図5】



実験Ⅱの結果を、時間の関数で表したエレクトロフェログラム

【図7】



実験Ⅱの結果を、電荷量の関数で表したエレクトロフェログラム